

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> : <b>C12N 15/29, C07K 13/00, A61K 39/36, G01N 33/53</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 94/23035</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	13. Oktober 1994 (13.10.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/AT94/00039</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>31. März 1994 (31.03.94)</b>			
(30) Prioritätsdaten: <b>A 672/93</b> <b>1. April 1993 (01.04.93)</b> <b>AT</b>		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DOLECEK, Christiane [AT/AT]; Anastasius Grüngasse 54/3/12, A-1180 Wien (AT). VRTALA, Susanne [AT/AT]; Pitkagasse 2/2/32, A-1210 Wien (AT). LAFFER, Sylvia [AT/AT]; Gymnasi- umstrasse 85/318, A-1190 Wien (AT). STEINBERGER, Peter [AT/AT]; Jurekgasse 28/7, A-1150 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Petersbachgasse 128, A-2380 Perchtoldsdorf (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT).			
(74) Anwälte: ITZE, Peter usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).			
(54) Title: RECOMBINANT TIMOTHY GRASS POLLEN ALLERGEN <i>Phl p II</i>			
(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES LIESCHGRASPOLLENALLERGEN <i>Phl p II</i>			
(57) Abstract			
<p>A recombinant DNA molecule codes for a peptide with the antigenicity of timothy grass pollen allergens <i>Phl p II</i>. The amino acid sequence (5) and the most important B cell and T cell epitopes of the molecule are derived therefrom. The recombinant <i>Phl p II</i> allergen is expressed in <i>Escherichia coli</i> and binds serum IgE of more than 60 % of all those allergic to grass pollen and may therefore be used in the same way as the naturally occurring <i>Phl p II</i> for processes based on antigen-antibody interaction, mediator release and T cell reactivity.</p>		<p><i>Phl p II</i></p> <p>ttg gat atc aac ccg tat cga tcc -24</p> <p>ATG TOC ATG GCG TCC TCC TCA ACC ACC ACC TTG CTG GCC ATG GCG 45 met ser met ala ser ser ser ser ser leu leu ala met ala</p> <p>CTG CTG GCG GCG CTG TTT GCG GCG GCG TGG TCC GTC CCG AAG GTG 90 val leu ala ala leu phe ala gly ala trp cys val pro lys val</p> <p>ACG TTC ACG GTG GAG AAG GCG TCC AAC GAG AAG CAC CTG GCG GTG 135 thr phe thr val glu lys gly ser asn glu lys his leu ala val</p> <p>CTG GTG AAG TAC GAG GCG GAC ACC ATG GCG GAG GTG GAG CTC CCG 180 leu val lys tyr glu gly asp thr met ala glu val phe leu arg</p> <p>GAG CAC GCG TCC GAC GAG TGG GTC GCG ATG ACC AAG GCG GAG GCG 225 glu his gly ser asp glu trp val ala met thr lys gly glu gly</p> <p>GCG GTG TGG ACG TTC GAC ACC GAG GAG CCG CTC CAG GCG CCG TTC 270 gly val trp thr phe asp ser glu glu pro leu gln gly pro phe</p> <p>AAC TTC CCG TTC CTC ACC GAG AAG GCG ATG AAG AAC GTC TTC GAC 315 asn phe arg phe leu thr glu lys gly met lys asn val phe asp</p> <p>GAC GTC GTC CCA GAG AGT ACA CCA TTG GCG GCG ACC TAC GCG CCA 360 asp val val pro glu ser thr pro leu gly ala thr tyr ala pro</p> <p>GAA GAG TAG 369 glu glu *</p> <p>cca tog gtc cat cca cat gca tga tga tcc ttc cat cca tct gat 45</p> <p>tta gtt oga ttt tcc ttg tgt ttt gga acg aat tgt tgc aaa tta 90</p> <p>cat gtt caa aga cat atg ttg cac gaa att ttt tac taa aaa 132</p>	
(57) Zusammenfassung			
<p>Ein rekombinantes DNA Molekül, das für ein Peptid mit der Antigenität des Lieschgras Pollen Allergens <i>Phl p II</i> kodiert. Davon werden die Aminosäuresequenz und die wichtigsten B-Zell und T-Zell Epitope des Moleküls abgeleitet. Das rekombinante <i>Phl p II</i> Allergen wurde in <i>Escherichia coli</i> exprimiert und bindet Serum IgE von mehr als 60 % aller Graspollenallergiker und kann daher ebenso wie das natürlich vorkommende <i>Phl p II</i> für Verfahren Anwendung finden, die auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, Mediatorfreisetzung, und T-Zell Reaktivität beruhen.</p>			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Rekombinantes Lieschgraspollenallergen *Phl p II*

Gräserpollenallergien gehören zu den wichtigsten pflanzlichen Allergien während des Sommers. Mehr als 20% der Pollenallergiker zeigen allergische Symptome auf Gräserpollen Allergene. Zu den wichtigsten Gräserpollenallergenen gehören Gruppe I (1), Gruppe V (2), Gruppe II/III (3) und Gruppe IV (4, 5) Allergene. Inzwischen wurde auch Profilin als Gräserpollen Allergen entdeckt (7, 8). Die erwähnten Allergene können als immunologisch und strukturell nahe verwandte Moleküle in Pollen unterschiedlicher Grasspezies gefunden werden und verwandte Allergene einer Gruppe zeigen Kreuzreaktivität mit Patienten IgE. Bisher ist eine Reihe dieser Allergene mittels rekombinanter Techniken isoliert und in *E. coli* exprimiert worden (9). Viele von den in *E. coli* exprimierten Allergenen zeigen ähnliche Eigenschaften wie die natürlichen Proteine und können daher für Diagnose und Therapie von allergischen Erkrankungen verwendet werden (10, 11, 12). Es wird nun erstmalig eine molekulare Charakterisierung einer vollständigen cDNA, die für *Phl p II* kodiert, sowie die Expression dieses Proteins in *E. coli* beschrieben. Ein vollständiges rekombinantes Gräserpollenallergen der Gruppe II/III war bisher nicht verfügbar und kann, wie aus den Beispielen ersichtlich ist, wie das natürliche Protein für Verfahren verwendet werden, die auf einer Antigen-Antikörperwechselwirkung beruhen, wie für zelluläre Verfahren Anwendung finden, da sämtliche T-Zell Epitope am rekombinanten Molekül vorhanden sind wie am natürlichen Molekül. Weiters ist das rekombinante *Phl p II* für Verfahren geeignet, die meßbare Mediatorfreisetzung zur Folge haben. Die therapeutische Verwendung des rekombinanten *Phl p II*, basierend auf einer Einwirkung auf immunoregulatorische Prozesse, Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, T-Zell Reaktivität und Mediatorfreisetzung folgt aus der strukturellen und biologischen Ähnlichkeit der natürlichen und rekombinanten Proteine. Die vorliegende Erfindung stellt eine vollständige cDNA, die für ein rekombinantes *Phl p II* Allergen kodiert, zur Verfügung. Anhand der von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz werden 30 B-Zell und T-Zell Epitope des *Phl p II* Allergens bestimmt. Das rekombinante

*Phl p* II Allergen wurde in *E. coli* hergestellt und besitzt ähnliche Eigenschaften wie natürliche Gräserpollenallergene der Gruppe II/III. Es folgt daraus, daß das rekombinante *Phl p* II Allergen so wie die natürlichen Allergene der Gruppe II/III für Verfahren verwendet werden kann, die auf einer Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, einer antigenabhängigen T-Zellwirkung oder einer antigenabhängigen Mediatorfreisetzung beruhen, wobei aber die rekombinanten Allergene noch den Vorteil der höheren Reinheit und höheren Spezifität aufweisen.

#### Material und Methoden:

10

##### 1. Konstruktion der cDNA Genbank

Lieschgraspollen (Allergon AB Engelholm, Schweden), der mit Hilfe von Licht- und Elektronenmikroskopie auf Reinheit untersucht worden war, wurde zur Isolierung von polyadenylierter RNA verwendet (13). cDNA Synthese wurde mit 15 oligo-dT und random Primern durchgeführt, die Enden der cDNA wurden mit T4-Polymerase glattverdaut und mit EcoRI-Linkern versehen. Die cDNA mit Linkern wurde in dephosphorylierte Lambda gtl1 Arme ligiert und verpackt. Es ergab sich eine cDNA Genbank von 800.000 unabhängigen Klonen (13).

##### 20 2. Screening der cDNA Genbank. Subklonierung und DNA Sequenzanalyse

IgE Screening der Lieschgraspollen cDNA Genbank wurde durchgeführt wie von Breiteneder et al., beschrieben (14). IgE bindende Klone wurden angereichert und aus diesen Klonen wurde Phagen-DNA präpariert (15). Mittels Kpn I und Sac I Schnitten konnten zwei DNA Fragmente erhalten werden, die beide Teile der 25 vollständigen *Phl p* II cDNA und flankierende lambda gtl1 Sequenzen enthielten. Die entstandenen KpnI/SacI und SacI DNA Fragmente wurden in das Plasmid pUC 18 subkloniert und *E. coli* XL-1 Blue damit transformiert. Durch Restriktionsanalyse wurden geeignete Klone identifiziert und mittels lambda gtl1 forward sequencing primer (22-mer) und lambda gtl1 reverse sequencing primer (22-mer), Clontech 30 Laboratories, Palo Alto, USA sowie mittels M13 pUC18 forward and reversed

primern, Boehringer-Mannheim, Deutschland, nach Sanger (16) beidsträngig sequenziert.

### 3. RNA (Northern) Blots

5      10 µg von Gesamt-RNA aus Pollen von Lieschgras (*Phleum pratense*) und Lolchgras (*Lolium perenne*) wurden mit Hilfe einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet (17). Zur Isolierung der cDNA die für *Phl p* II kodiert wurde ausgehend von rekombinanten Phagen das entsprechende DNA Insert mittels PCR amplifiziert. Es wurden jeweils 5 picomol  
10 primer (lambda gtl1 forward sequencing primer (22-mer) und lambda gtl1 reverse sequencing primer (22-mer), Clontech Laboratories, USA) eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und die Bande wurde mittels DEAE-Ionenaustauscherpapier eluiert (18). Die gewonnene DNA wurde mittels random priming <sup>32</sup>P-markiert (19). Prähybridisierung und Hybridisierung  
15 wurden nach Standardmethoden durchgeführt (15). Die Blots wurden mit 3.0xSSC (20xSSC = 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0), 0.1% SDS (Natriumdodecylsulfat); 1.5 SSC, 0.1% SDS und anschließend mit 0.75% SSC, 0.1% SDS bei 50°C gewaschen und autoradiographiert (Hyperfilm MP, Amersham, London, UK).

### 20      4. Expression der *Phl p* II cDNA in lysogenen *E. coli* Y1089 als β-Galaktosidasefusionsprotein

Mit Hilfe von IgE Screening wurde ein vollständiger cDNA Klon erhalten, der für ein *Phl p* II Allergen kodiert. Mit rekombinanten Lambda gtl1 Phagen wurde der lysogene *E. coli* Stamm Y1089 infiziert und aus dem Ansatz wurde das  
25 β-Galactosidase-Fusionsprotein gewonnen (20). Der Ansatz wurde in einem 7.5% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (21) und auf Nitrocellulose geblottet (22). Das Fusionsprotein wurde mit Hilfe von Serum-IgE von graspollenallergischen Patienten und einem jodmarkierten Kaninchen-anti-human IgE Antikörper (Pharmacia, Uppsala, Schweden) detektiert.

Die angeschlossenen Figuren dienen der Illustration der Verwendbarkeit des rekombinanten *Phl p* II Allergens für Verfahren, die auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, antigenabhängiger Mediatorfreisetzung, sowie antigenabhängiger zellulärer Reaktivität beruhen. Figur 1 zeigt die cDNA und die 5 davon abgeleitete Aminosäuresequenz des rekombinanten *Phl p* II Allergens. Es ist die vollständige cDNA Sequenz des *Phl p* II Allergens angeführt. Eine 24 Basen lange nichtkodierende Sequenz wurde am 5' Ende der cDNA vorgefunden, worauf eine 78 Basen lange Führungssequenz folgt, die für das in der Abbildung unterstrichene Signalpeptid kodiert (23). Die Aminosäuresequenz des reifen Proteins 10 kann ab Base 78 abgeleitet werden und beginnt mit Valin. Das Stopcodon TAG, welches die kodierende Sequenz am 3' Ende abbricht, ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die 3 nicht kodierende Sequenz wird im poly A Schwanz beendet.

Figur 2 veranschaulicht die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz des rekombinanten *Phl p* II Allergens mit anderen Gruppe II/III Gräserpollenallergenen.

15 Figur 3 gibt die Beschreibung von B-Zell Epitopen des rekombinanten *Phl p* II Allergens wieder, und Figur 4 jene der T-Zell Epitope.

Figur 5 zeigt die Reaktivität des rekombinanten *Phl p* II Allergens mit Serum IgE von Graspollenallergikern. Rekombinantes *Phl p* II wurde als  $\beta$ -Galaktosidase Fusionsprotein in lysogenen *E. coli* Y1089 mittels Phageninfektion und Induktion 20 mit IPTG exprimiert. Die *E. coli* Proteine, welche das rekombinante *Phl p* II enthalten, wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. In Spur 1 wurde Serum IgE von einem Gruppe II/III reaktiven Patienten verwendet, in den Spuren 2 und 3 wurde mit IgE von Allergikern detektiert, die keine Reaktion mit Gruppe II/III Allergenen zeigen, und Spur 4 zeigt die Kontrolle mit Serum einer 25 nicht allergischen Kontrollperson.

Figur 6 gibt eine Tabelle wieder, die den Prozentsatz von graspollenallergischen Patienten mit IgE-Reaktivität gegen bestimmte Graspollenallergene auflistet. Es wird die Häufigkeit der Reaktivität von Graspollenallergikern mit verschiedenen Gräserpollenallergenen gezeigt. Die Werte 30 sind Richtwerte, die durch Testen mit natürlichen und rekombinanten

Gräserpollenallergenen in einer repräsentativen Anzahl von Patienten erhoben wurden.

Figur 7 belegt, daß rekombinantes *Phl p II* gleiche IgE-Epitope wie natürliche Gruppe II/III Allergene-IgE-Inhibition trägt. Das Serum eines Graspollenallergikers, 5 der mit Gruppe II/III Allergenen (10-12kD) und Gruppe I Allergenen (etwa bei 30 kD) IgE-Reaktivität zeigt, wurde mit rekombinatem *Phl p II* (Spur 2), rekombinatem *Phl p I* (Spur 3), rekombinatem *Bet v I* (Spur 4), oder *E. coli*-Proteinen (Spur 1) vorinkubiert. Vorinkubation mit rekombinanten *Phl p II* bringt die IgE-Bindung an natürliches *Phl p II* im 12 kD Bereich fast völlig zum 10 verschwinden, während die Reaktivität mit *Phl p I* bei 30 kD nicht beeinträchtigt wird. Rekombinantes *Phl p I* reduziert nur die Bindung an natürliches *Phl p I*, hat aber keine Wirkung auf die IgE-Bindung an *Phl p II*. Die Vorinkubation mit Kontrollproteinen, rekombinanten *Bet v I* und *E. coli* Proteinen beeinträchtigt die IgE-Bindung an natürliches *Phl p I* und *Phl p II* nicht. Daraus folgt, daß 15 rekombinantes *Phl p II* ähnliche oder gleiche IgE-Epitope wie natürliches *Phl p II* trägt, jedoch keine antigene Verwandtschaft mit natürlichen oder rekombinanten Allergenen der Gruppe I gegeben ist.

Figur 8 verdeutlicht die Hybridisierung der cDNA, die für *Phl p II* kodiert, mit mRNA aus Lieschgras und Lolchgras. Gesamt RNA wurde aus Lolchgras (Spur1) 20 und Lieschgras (Spur 2) Pollen isoliert, 10, µg im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die mit Phosphor 32 markierte cDNA, für kodierend für *Phl p II*, hybridisiert sowohl mit Lolchgras als auch Lieschgras RNA etwa in Höhe der 18S RNA aber auch deutlich darunter bei etwa 600 Basen Transkriptgröße. Die Kreuzhybridisierung zeigt die strukturelle Ähnlichkeit der 25 Transkripte welche für Gruppe II/III Allergene in verschiedenen Grasspezies kodieren.

Figur 9 A und B zeigt die Reaktivität des rekombinanten *Phl p II* Allergens mit einem Antikörper spezifisch für Gruppe II/III Gräserpollenallergene

A: Lambda gtl1 Phagen, die Lieschgraspollenallergene und das Hauptallergen 30 der Birke, *Bet v I* (Co), exprimieren sowie nicht rekombinante Phagen ( $\lambda$ ) wurden

im Dot Blot Verfahren mit Antikörpern spezifisch für Graspollenallergene getestet. 4B 1 bindet an Gruppe V Allergene, R4 detektiert Gruppe I Allergene, und R5 identifiziert Gruppe V und Gruppe II/III Allergene. B: Die Graphik illustriert die Klonbezeichnung. Rekombinantes *Phl p* II wird von Klon A exprimiert.

5

### Beispiele:

#### Sequenzanalyse des rekombinanten *Phl p* II Allergens-Ähnlichkeit mit anderen

##### 10 Gruppe II/III Allergenen

Die DNA Sequenz des *Phl p* II Allergens wurde durch Sequenzierung der cDNA nach der Methode von Sanger (16) bestimmt. Abbildung 1 zeigt die bestimmte DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Ein dem reifen Protein voranstehendes Signalpeptid, das signifikante Homologie mit anderen 15 eukaryotischen Signalpeptiden zeigt, beweist eindeutig, daß Gruppe II/III Allergene von distinkten Genabschnitten kodiert werden und nicht durch proteolytischen Zerfall aus Gruppe I Allergenen entstehen. Die in Abbildung 2 gezeigte hohe Sequenzhomologie (ungefähr 70% Sequenidentität) des rekombinanten *Phl p* II mit den homologen Proteinen aus dem Lolchgras (*Lol p* II und *Lol p* III) zeigt die enge 20 strukturelle Verwandtschaft dieser Proteine und liefert damit die molekulare Basis für die immunologische Verwandtschaft von Gruppe II/III Allergenen verschiedener Spezies.

#### Bestimmung der B-Zell und T-Zell Epitope des rekombinanten *Phl p* II

##### 25 Allergens

Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *Phl p* II Allergens konnten die B-Zell und T-Zell Epitope unter Verwendung geeigneter Computerprogramme (24, 25) bestimmt werden. Die relevanten B-Zell und T-Zell Epitope sind in den Figuren 3 und 4 zusammengefaßt. Synthetische Peptide, die B-Zell Epitopen entsprechen, 30 binden IgE von Graspollenallergikern, während synthetische Peptide, die T-Zell

Epitopen entsprechen, T-Zellen von Graspollenallergikern zur Proliferation anregen und erhöhte H3-Thymidinaufnahme zur Folge haben.

Expression der cDNA kodierend für *Phl p* II in *E. coli* als rekombinantes  
5 *Phl p* II Allergen

Rekombinante Phagen, die die cDNA für *Phl p* II enthalten, wurden zur Infektion mit lysogenem *E. coli* Y 1089 verwendet. Rekombinantes  $\beta$ -Galaktosidase Fusionsprotein wurde durch Induktion mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -Thiogalaktosid) in Flüssigkultur gewonnen (20). Das Kontrollprotein  $\beta$ -Galaktosidase zeigte keine  
10 IgE-Bindung am Western Blot während das rekombinante *Phl p* II Fusionsprotein spezifisch mit Serum IgE von Patienten, die mit Gruppe II/III Allergenen verschiedener Grasspezies reagierten, deutliche IgE-Bindung zeigte.

IgE-Bindungsfähigkeit des rekombinanten *Phl p* II Allergens

15 Serum eines Graspollenallergikers, der mit natürlichen Allergenen der Gruppe II/III reagiert, wurde mit rekombinanten *Phl p* II vorinkubiert und damit Gruppe II/III spezifisches IgE abgebunden. Figur 6 zeigt, daß die Bindung an natürliche Gruppe II/III Allergene fast vollständig durch die Vorinkubation ausgelöscht wird, während die Bindung an Gruppe I und Gruppe V Allergene nicht beeinflusst wurde.  
20 Dies zeigt, daß die IgE-Epitope von natürlichen Gruppe II/III Allergenen durch rekombinantes *Phl p* II abgedeckt werden, und daß kaum relevante Kreuzreaktivität zwischen Gruppe I, Gruppe V und Gruppe II/III Allergenen bestehen.

Kreuzhybridisierung der *Phl p* II cDNA mit *Lol p* II/III mRNA

25 Gesamt RNA von Lolchgras und Lieschgraspollen wurde isoliert, im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membran wurde mit einer vollständigen cDNA, die für *Phl p* II kodiert, hybridisiert. Hybridisierende Banden finden sich jeweils in Höhe der 18S ribosomalen RNA sowie deutlich darunter. Die Hybridisierung ist deutlich intensiver  
30 mit Lieschgras RNA als mit Lolchgras, RNA obwohl nach der Gelfärbung mit

Ethidiumbromid etwa gleiche Mengen Gesamt RNA verwendet wurden. Dennoch konnte unter stringenten Bedingungen Kreuzhybridisierung erzielt werden. Das größere Transkript stellt unter Umständen eine größere und noch unreife RNA dar, da die Hybridisierung auch stringentem Waschen standhielt. Dieses Beispiel soll die 5 Homologie der Gruppe II/III Gräserpollenallergene verschiedener Spezies dokumentieren.

10

15

20

25

30

**Literaturnachweis:**

1. Freidhoff, L.R., Ehrlich-Kautzky, E., Grant, J.H., Meyers, D.A., and Marsh, D.G. (1986) *J Allergy Clin Immunol* 78, 1190-1201
- 5     2. Matthiesen, F., Lowenstein, H. *Clin Exp Allergy* 21, 309-320.
3. Ansari, A.A., Shenbagamurthi, P., and Marsh, D.G. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 11181-11185
4. Kisil, F. T., Jaggi, K. S., Lin, Z. W., Ekramodullah, A. K. M. (1989) in Schon A. H., Kraft, D., Kunkel, G. eds. *Epitopes of Atopic Allergens*, 22-25.
- 10     5. Jaggi, K. S., Ekramodullah, A. K. M., Kisil, F. T., Dzuba-Fischer, J. M. M., Rector, E. S., and Schon, A. H. (1989) *J Allergy Clin Immunol* 83, 845-852.
6. van Ree, R., Driessen, N. B. M., van Leeuwen, W. A., Stapel, S. O., and Aalberse, R. C. (1992) *Clin Exp Allergy*.
7. Valenta, R., Duchêne, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, 15 P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1992) *J Exp Med* 175, 377-385.
8. Valenta, R., Duchêne, M., Vrtala, S., Valent, P., Sillaber, C., Ferreira, F., Tejkl, M., Hirschwehr, R., Ebner, C., Kraft, D., and Scheiner, O. (1993) *Int Arch Allergy Appl Immunol* 99, 271-273.
- 20     9. Scheiner, O., Bohle, B., Breitenbach, M., Breiteneder, H., Duchêne, M., Ebner, C., Ferreira, F., Hirschwehr, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Pettenburger, K., Rumpold, H., Steiner, R., Tejkl, M., Valenta, R., and Kraft, D. (1992) in: *Advances in Allergology and Clinical Immunology*, Godard, P., Bousquet, J., and Michel, F. B. eds. The Parthenon Publishing Group.
- 25     10. Valenta, R., Duchêne, M., Vrtala, S., Birkner, T., Ebner, C., Hirschwehr, R., Breitenbach, M., Rumpold, H., Scheiner, O., and Kraft, D. (1991) *J Allergy Clin Immunol* 88, 889-894.
11. Valenta, R., Vrtala, S., Ebner, C., Kraft, D., and Scheiner, O. (1992) *Int Arch Allergy Appl Immunol* 97, 287-294

12. Valenta, R., Sperr, W. R., Ferreira, F., Valent, P., Sillaber, C., Tejkl, M., Duchêne, M., Ebner, C., Lechner, K., Kraft, D., and Scheiner, O. (1993). *J Allergy Clin Immunol* 91, 88-97.
13. Vrtala, S., Sperr, W. R., Reimitzer, I., vanRee, R., Laffer, S., Müller, S W.-D., Valent, P., Lechner, K., Rumpold, H., Kraft, D., Scheiner, O., and Valenta, R. (1993) *J Immunol* (accepted provided revision).
14. Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., and Breitenbach, M. (1989) *EMBO J* 8, 1935-1938
15. Ausubel, F. M. (1990) in *Current protocols in molecular biology*, Wiley, 10 New York.
16. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5468.
17. Valenta, R., Breiteneder, H., Pettenburger, K., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., and Scheiner, O. (1991) *J Allergy Clin Immunol* 87, 15 677-682.
18. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
19. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) *Anal Biochem* 132, 6-13.
20. Huynh, T. V., Young, R. A., Davis, R. W. (1985) in: *cDNA cloning*, 20 Oxford, IRL Press, vol I, 49-78.
21. Laemmli U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
22. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.
23. Gavel, Y., and Heijne, G. (1990) *FEBS Lett* 261, 455-458.
- 25 24. Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) *J Mol Biol* 157, 105-132.
25. Margalit, H., Spouge, J. L., Cornette, J. L., Cease, K. B., Delisi, C., and Berzofsky, J. A. (1987) *J Immunol* 138, 2213-2229.

## PATENTANSPRÜCHE:

1. Rekombinantes DNA Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die für ein Polypeptid kodiert, das die Antigenität des  
5 Allergens *Phl p* II (Lieschgras Pollen Allergen), insbesondere monokotyledoner Gewächse, besitzt oder für ein Peptid, das mindestens ein Epitop dieses Allergens aufweist, sowie eine Nukleinsäuresequenz, die mit der genannten Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

2. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
10 daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit der in Abb. 1 dargestellten gesamten Sequenz oder Teilbereichen derselben in homologer Weise übereinstimmt.

3. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die durch Degeneration aus der in Abb. 1 dargestellten Sequenz ableitbar ist.

15 4. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die für ein Polypeptid kodiert, das als Antigen kreuzreaktiv mit dem *Phl p* II Allergen, insbesondere monokotyledoner Gewächse, ist und zu diesem eine hohe Homologie aufweist.

5. Rekombinantes DNA Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch  
20 gekennzeichnet, daß es funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz zu einem Expressionskonstrukt verbunden ist.

6. Wirtssystem, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem rekombinanten Expressionskonstrukt nach Patentanspruch 5 transformiert ist.

7. Aus einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 abgeleitetes  
25 rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die Antigenität von *Phl p* II oder zumindest eines Epitops davon aufweist.

8. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder ein Polypeptid nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der in Abb. 1 gezeigten Sequenz im Ganzen oder in Teilen entspricht.

9. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Fusionsprodukt darstellt, das die Antigenität des *Phl p* II Allergens des Lieschgrases oder zumindest eines Epitops davon aufweist und einen zusätzlichen Polypeptidanteil aufweist, wobei 5 das gesamte Fusionsprodukt von der DNA eines Expressionskonstrukts gemäß Anspruch 5 kodiert wird.

10. Rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach Patentanspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der besagte zusätzliche Polypeptidanteil  $\beta$ -Galactosidase oder ein anderes zur Fusion geeignetes Polypeptid 10 ist.

11. Diagnostisches oder therapeutisches Reagens, dadurch gekennzeichnet, daß es ein synthetisches Protein oder Polypeptid gemäß einem der Patentansprüche 7 bis 10 enthält.

12. Verfahren, zum *in vitro* - Nachweis der Allergie eines Patienten gegen das 15 *Phl p* II Allergen, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion der IgE Antikörper im Serum des Patienten mit einem rekombinanten oder synthetischen Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 7 bis 10 gemessen wird.

13. Verfahren, zum *in vitro* - Nachweis der zellulären Reaktion auf das 20 *Phl p* II Allergen, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 7 bis 10 zur Stimulierung oder Hemmung der zellulären Reaktion eingesetzt wird.

14. Verfahren zur Behandlung eines Säugetieres, das eine Pollenallergie aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß ihm ein rekombinantes oder synthetisches Protein oder Polypeptid nach einem der Patentansprüche 7 bis 10 verabreicht wird.

1/12

Phl p II

ttg gat atc aac ccg tat cga tcc -24

ATG TCC ATG GCG TCC TCC TCA AGC AGC AGC TTG CTG GCC ATG GCG 45  
met ser met ala ser ser ser ser ser ser leu leu ala met ala

GTG CTG GCG GCG CTG TTT GGC GGC GCG TGG TGC GTC CCG AAG GTG 90  
val leu ala ala leu phe ala gly ala trp cys val pro lys val

ACG TTC ACG GTG GAG AAG GGG TCC AAC GAG AAG CAC CTG GCG GTG 135  
 thr phe thr val glu lys gly ser asn glu lys his leu ala val

CTG GTG AAG TAC GAG GGG GAC ACC ATG GCG GAG GTG GAG CTC CGG 180  
 leu val lys tyr glu gly asp thr met ala glu val phe leu arg

GAG CAC GGC TCC GAC GAG TGG GTC GCC ATG ACC AAG GGG GAG GGC 225  
 glu his gly ser asp glu trp val ala met thr lys gly glu gly

GGC GTG TGG ACG TTC GAC AGC GAG GAG CCG CTC CAG GGG CCC TTC 270  
 gly val trp thr phe asp ser glu glu pro leu gln gly pro phe

AAC TTC CGG TTC CTC ACC GAG AAG GGC ATG AAG AAC GTC TTC GAC 315  
 asn phe arg phe leu thr glu lys gly met lys asn val phe asp

GAC GTC GTC CCA GAG AGT ACA CCA TTG GGG GCC ACC TAC GCG CCA 360  
 asp val val pro glu ser thr pro leu gly ala thr tyr ala pro

GAA GAG TAG 369  
 glu glu \*

cca tcg gtc cat cca cat gca tga tga tcc ttc cat cca tct gat 45

tta gtt cga ttt tcc ttg tgt ttt gga acg aat tgt tgc aaa tta 90

cat gtt caa aga cat atg ttg cac gaa att ttt tac taa aaa 132

Fig. 1

II d

Vol p II

PHL p II

Lol p III

```
AAPVEFTVEKGSDEKNLALSIKYNKEGDSMAEVELKEHGS  
| | | | | | | | | | | | | | |  
M$M$SSSSLLAMAVLAALFAGAWCVPKVTFTEKGSNEKHLAVLVKY--EGDTMAEVELREHGS  
|| | | | | | | | | | | | | | |
```

2/12

lol p II

II d phl p II

Lol p III

NEWLALKKNGDGVWEIKSDKPLKGPFNFREFVSEKGMNVFDDVVPADFVKVGTTY-PEK  
 ||| | || ||||| ||||| ||||| ||||| |||||  
 DEWVAMTKGEGGVTFDSEEPLOQPFNFRFLTEKGMKNVFDDVVPSTPLGATYAPEE  
 ||||| | ||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||  
 EEWEPMTKKG-NLWEVKSAPLTGPMNFRFLSKGGMKNVFDEVIPFAFTVGKTYTPEYN

Fig. 2

3/12

*Phl p* II B-Zell Epitope :

Folgende B-Zell Epitope wurden bestimmt :

Epitop 1 : VEKGSNEKH	(AS 8-16)
Epitop 2 : KYEGDT	(AS 22-27)
Epitop 3 : REHGSDE	(AS 34-40)
Epitop 4 : TKGEGGV	(AS 45-51)
Epitop 5 : FDSEEPLQGPF	(AS 54-64)
Epitop 6 : LTEKGMKN	(AS 69-76)
Epitop 7 : FDDVVPESTPLGATYA	(AS 78-93)

Fig. 3

4/12

*Phl p* II T-Zell Epitope :

Folgende T-Zell Epitope wurden bestimmt :

- Epitop 1 : TVEKGSNEKHL (AS 7-17)
- Epitop 2 : KHLAVLVK YEG (AS 15-25)
- Epitop 3 : LVKYEGDTMAE (AS 20-30)
- Epitop 4 : KYEGDTMAEVF (AS 22-32)
- Epitop 5 : GDTMAEVFLRE (AS 25-35)
- Epitop 6 : DTMAEVFLREH (AS 26-36)
- Epitop 7 : TMAEVFLREHG (AS 27-37)
- Epitop 8 : MAEVFLREHGS (AS 28-38)
- Epitop 9 : AEVFLREHGSD (AS 29-39)
- Epitop 10 : FLREHGSDEWV (AS 32-42)
- Epitop 11 : LREHGSDEWVA (AS 33-43)
- Epitop 12 : TFDSEEPLQGP (AS 53-63)
- Epitop 13 : DSEEPLQGPFN (AS 55-65)
- Epitop 14 : FRFLTEKGMKN (AS 66-76)
- Epitop 15 : RFLTEKGMKNV (AS 67-77)
- Epitop 16 : FLTEKGMKNVF (AS 68-78)
- Epitop 17 : LTEKGMKNVFD (AS 69-79)
- Epitop 18 : TEKGMKNVFDD (AS 70-80)
- Epitop 19 : EKGGMKNVFDDV (AS 71-81)
- Epitop 20 : KGMKNVFDDVV (AS 72-82)
- Epitop 21 : GMKNVFDDVVP (AS 73-83)

Fig. 4

5/12

Epitop 22 : MKNVFDDVVPE (AS 74-84)

Epitop 23 : KNVFDDVVPES (AS 75-85)

Epitop 24 : NVFDDVVPEST (AS 76-86)

Epitop 25 : VFDDVVPESTP (AS 77-87)

Fig. 4 Fortsetzung

6/12

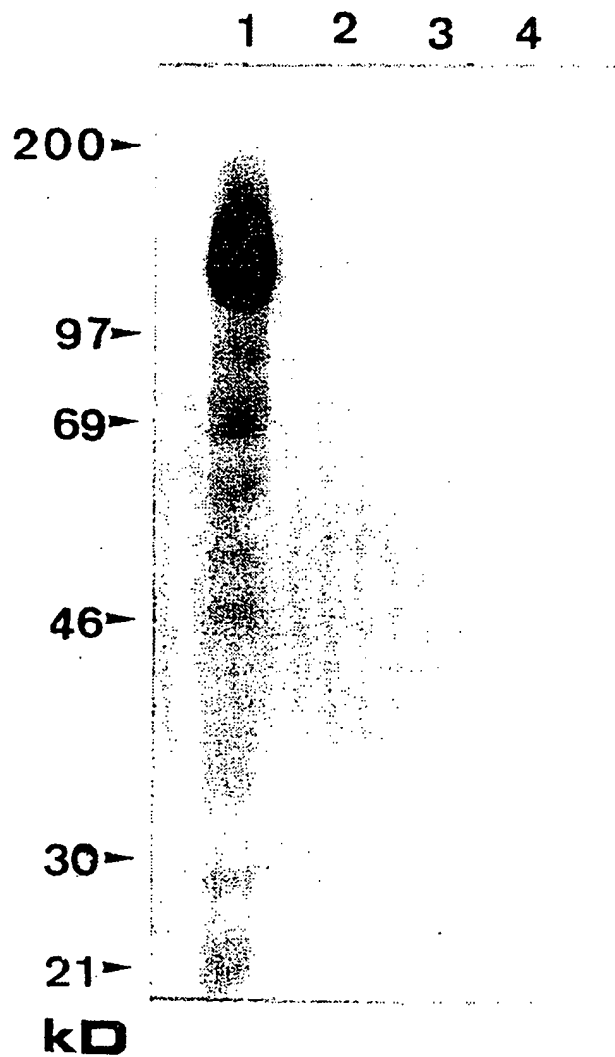


Fig. 5

7/12

Allergen	Prozentsatz der reaktiven Graspollenallergiker
Gruppe I	>90%
Gruppe II/III	60%
Gruppe IV	50%
Gruppe V	>80%
Profilin	20%

Fig. 6

8/12

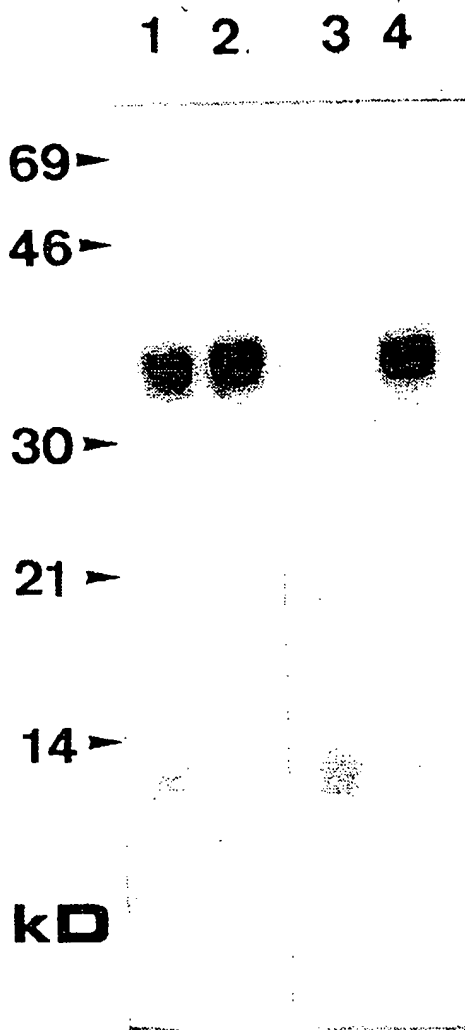


Fig. 7

9/12

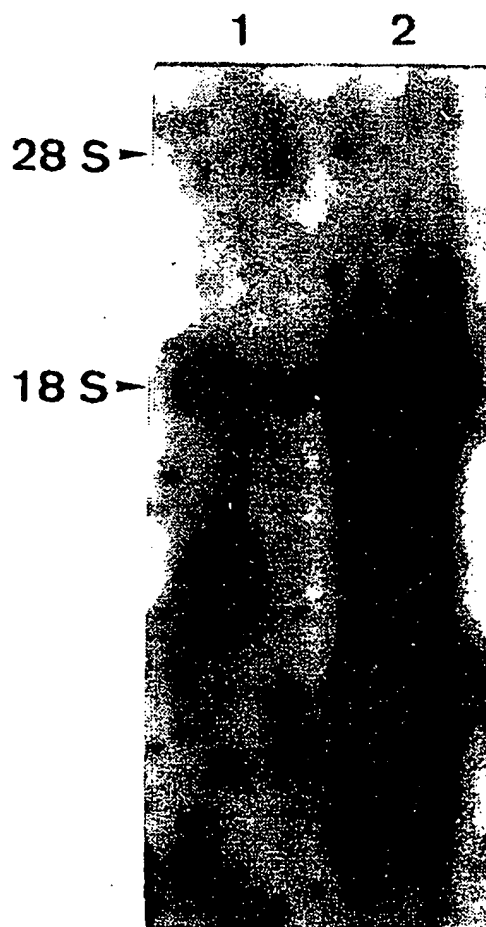


Fig. 8

10/12

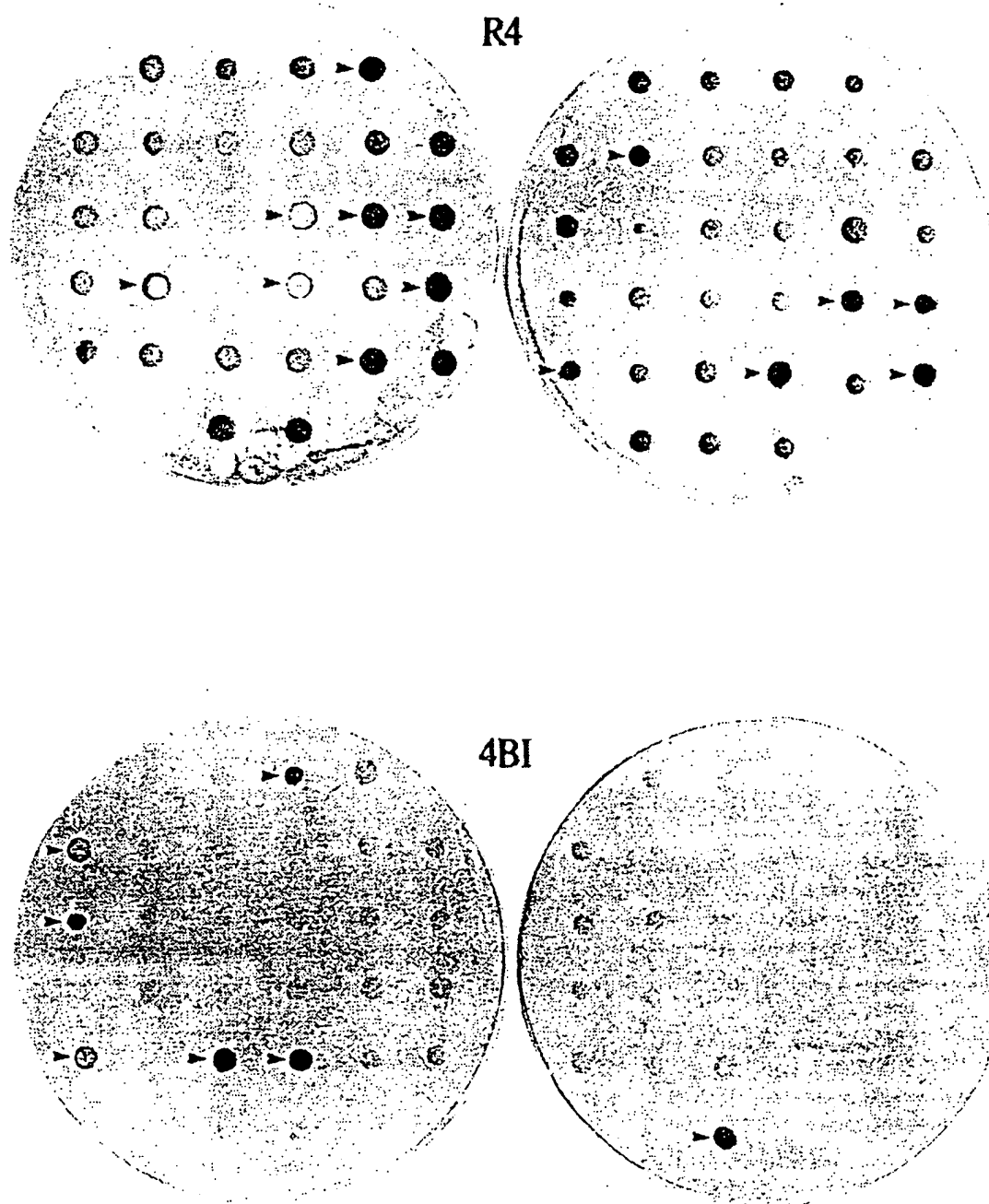


Fig. 9A

11/12

R5

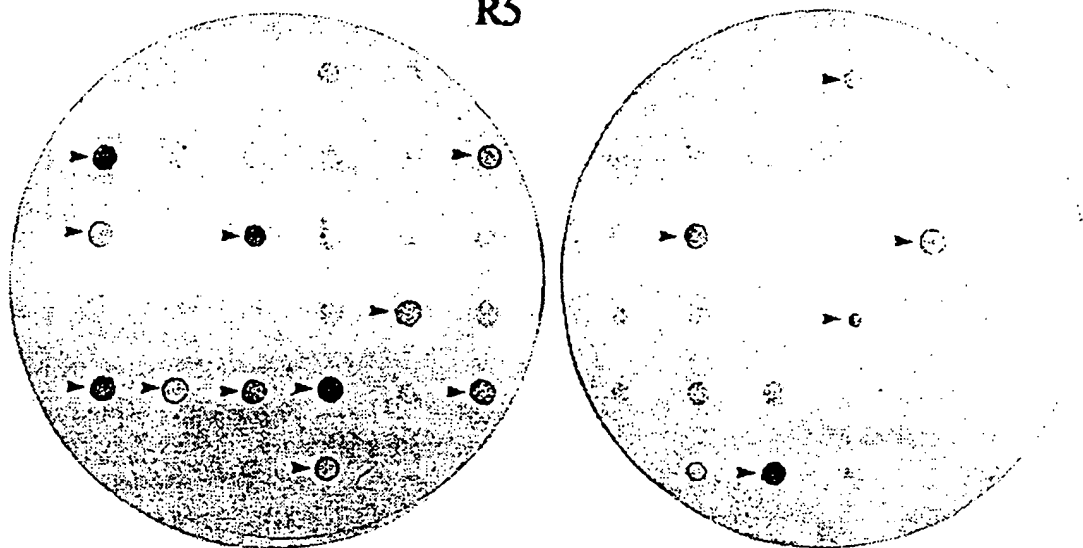


Fig. 9A

	11	10	8	1	
	25	20	18	15	14    13
	41	40	36	35	33    31
	76	55	61	59	$\overline{Ph}_{q,\overline{\Pi}}$ 43
	115	108	99	95	90    82
	$\lambda$			122	116

	139	134	133	123	
	163	162	158	153	144    140
	192	177	176	171	170    164
	235	222	218	207	200    196
	305	303	300	270	265    238
				Co	322    316

**Fig. 9B**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :  C12N 15/29, C07K 13/00, A61K 39/36, G01N 33/53		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/23035  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Oktober 1994 (13.10.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT94/00039 (22) Internationales Anmeldedatum: 31. März 1994 (31.03.94)  (30) Prioritätsdaten: A 672/93 1. April 1993 (01.04.93) AT  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DOLECEK, Christiane [AT/AT]; Anastasius Grüngasse 54/3/12, A-1180 Wien (AT). VRTALA, Susanne [AT/AT]; Pitkagasse 2/2/32, A-1210 Wien (AT). LAFFER, Sylvia [AT/AT]; Gymnasi- umstrasse 85/318, A-1190 Wien (AT). STEINBERGER, Peter [AT/AT]; Jurekgasse 28/7, A-1150 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Petersbachgasse 128, A-2380 Perchtoldsdorf (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT).  (74) Anwälte: ITZE, Peter usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.  (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 24. November 1994 (24.11.94)	
(54) Title: RECOMBINANT TIMOTHY GRASS POLLEN ALLERGEN <i>Phl p II</i>			
(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES LIESCHGRASPOLLENALLERGEN <i>Phl p II</i>			
(57) Abstract			
<p>A recombinant DNA molecule codes for a peptide with the antigenicity of timothy grass pollen allergens <i>Phl p II</i>. The amino acid sequence (5) and the most important B cell and T cell epitopes of the molecule are derived therefrom. The recombinant <i>Phl p II</i> allergen is expressed in <i>Escherichia coli</i> and binds serum IgE of more than 60 % of all those allergic to grass pollen and may therefore be used in the same way as the naturally occurring <i>Phl p II</i> for processes based on antigen-antibody interaction, mediator release and T cell reactivity.</p>		<p><i>Phl p II</i></p> <p>ttg gat atc aac cag tat cga tcc -24</p> <p>ATG TCC ATG GCG TCC TCC TCA AGC AGC ACC TTG CTG GGC ATG GCG 45 <u>met ser met ala ser ser ser ser ser leu leu ala met ala</u></p> <p>GTG CTG GCG GCG CTG TTT GGC GGC GCG TGG TGC GTC CCG AAG GTG 90 <u>val leu ala ala leu phe ala gly ala trp cys val pro lys val</u></p> <p>ACG TTC ACG GTG GAG AAG GCG TCC AAC GAG AAG CAC CTG GCG GTG 135 thr phe thr val glu lys gly ser asn glu lys his leu ala val</p> <p>CTG GTG AAG TAC GAG GCG GAC ACC ATG GCG GAG GTG GAG CTC CCG 180 leu val lys tyr glu gly asp thr met ala glu val phe leu arg</p> <p>GAG CAC GGC TCC GAG GAG TGG GTC GGC ATG ACC AAG GCG GAG GCG 225 glu his gly ser asp glu trp val ala met thr lys gly glu gly</p> <p>GCC GTG TGG ACG TTC GAC AGC GAG GAG CCG CTC CAG GCG CCC TTC 270 gly val trp thr phe asp ser glu glu pro leu gln gly pro phe</p> <p>AAC TTC CCG TTC CTC ACC GAG AAG GCG ATG AAG AAC GTC TTC GAC 315 asn phe arg phe leu thr glu lys gly met lys asn val phe asp</p> <p>GAC GTC GTC CCA GAG AGT ACA CCA TTG GCG GCG ACC TAC GCG CCA 360 asp val val pro glu ser thr pro leu gly ala thr tyr ala pro</p> <p>GAA GAG TAG 369 glu glu *</p> <p>cca tog gtc cat cca cat gca tga tga tcc ttc cat cca tct gat 45</p> <p>tta gtt cga ttt tcc ttg tgt ttt gga acg aat tgt tgc aaa tta 90</p> <p>cat gtt caa aga cat atg ttg cac gaa att ttt tac taa aaa 132</p>	
(57) Zusammenfassung			
<p>Ein rekombinantes DNA Molekül, das für ein Peptid mit der Antigenität des Lieschgras Pollen Allergens <i>Phl p II</i> kodiert. Davon werden die Aminosäuresequenz und die wichtigsten B-Zell und T-Zell Epitope des Moleküls abgeleitet. Das rekombinante <i>Phl p II</i> Allergen wurde in <i>Escherichia coli</i> exprimiert und bindet Serum IgE von mehr als 60 % aller Graspollenallergiker und kann daher ebenso wie das natürlich vorkommende <i>Phl p II</i> für Verfahren Anwendung finden, die auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, Mediatorfreisetzung, und T-Zell Reaktivität beruhen.</p>			



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> : <b>C12N 15/29, C07K 13/00, A61K 39/36, G01N 33/53</b></p>	<b>A3</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 94/23035</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>13. Oktober 1994 (13.10.94)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/AT94/00039</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>31. März 1994 (31.03.94)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: <b>A 672/93                      1. April 1993 (01.04.93)                      AT</b></p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>BIOMAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H. [AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT).</b></p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>DOLECEK, Christiane [AT/AT]; Anastasius Grüngasse 54/3/12, A-1180 Wien (AT). VRTALA, Susanne [AT/AT]; Pitkgasse 2/2/32, A-1210 Wien (AT). LAFFER, Sylvia [AT/AT]; Gymnasi- umstrasse 85/318, A-1190 Wien (AT). STEINBERGER, Peter [AT/AT]; Jurekgasse 28/7, A-1150 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Petersbachgasse 128, A-2380 Perchtoldsdorf (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT).</b></p> <p>(74) Anwälte: <b>ITZE, Peter usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).</b></p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: <b>24. November 1994 (24.11.94)</b></p>
<p>(54) Title: <b>RECOMBINANT TIMOTHY GRASS POLLEN ALLERGEN <i>Phl p II</i></b></p> <p>(54) Bezeichnung: <b>REKOMBINANTES LIESCHGRASPOLLENALLERGEN <i>Phl p II</i></b></p> <p>(57) Abstract</p> <p>A recombinant DNA molecule codes for a peptide with the antigenicity of timothy grass pollen allergens <i>Phl p II</i>. The amino acid sequence (5) and the most important B cell and T cell epitopes of the molecule are derived therefrom. The recombinant <i>Phl p II</i> allergen is expressed in <i>Escherichia coli</i> and binds serum IgE of more than 60 % of all those allergic to grass pollen and may therefore be used in the same way as the naturally occurring <i>Phl p II</i> for processes based on antigen-antibody interaction, mediator release and T cell reactivity.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Ein rekombinantes DNA Molekül, das für ein Peptid mit der Antigenität des Lieschgras Pollen Allergens <i>Phl p II</i> kodiert. Davon werden die Aminosäuresequenz und die wichtigsten B-Zell und T-Zell Epitope des Moleküls abgeleitet. Das rekombinante <i>Phl p II</i> Allergen wurde in <i>Escherichia coli</i> exprimiert und bindet Serum IgE von mehr als 60 % aller Graspollenallergiker und kann daher ebenso wie das natürlich vorkommende <i>Phl p II</i> für Verfahren Anwendung finden, die auf Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, Mediatorfreisetzung, und T-Zell Reaktivität beruhen.</p>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><i>Phl p II</i></p> <p>ttg gat atc aac ccg tat cga tcc</p> <p>ATG TCC ATG GCG TCC TCC TCA AGC AGC AGC TTG CTG GCC ATG GCG 45 <u>met ser met ala ser ser ser ser ser ser leu ala met ala</u></p> <p>GTG CTG GCG GCG CTG TTT GCG GCG GCG TGG TGC GTC CCG AAG GTG 90 <u>val leu ala ala leu phe ala gly ala trp cys val pro lys val</u></p> <p>ACG TTC ACG GTG GAG AAG GCG TCC AAC GAG AAG CAC CTG GCG GTG 135 <u>thr phe thr val glu lys gly ser asn glu lys his leu ala val</u></p> <p>CTG GTG AAG TAC GAG GCG GAC ACC ATG CCG GAG GTG GAG CTC CCG 180 <u>leu val lys tyr glu gly asp thr met ala glu val phe leu arg</u></p> <p>GAG CAC GCG TCC GAC GAG TGG GTC GCC ATG ACC AAG CCG GAG GCC 225 <u>glu his gly ser asp glu trp val ala met thr lys gly glu gly</u></p> <p>GCC GTG TGG ACG TTC GAC ACC GAG GAG CCG CTC CAG GCG CCG TTC 270 <u>gly val trp thr phe asp ser glu glu pro leu gln gly pro phe</u></p> <p>AAC TTC CCG TTC CTC ACC GAG AAG GCG ATG AAG AAC GTC TTC GAC 315 <u>asn phe arg phe leu thr glu lys gly met lys asn val phe asp</u></p> <p>GAC GTC GTC CCA GAG AGT ACA CCA TTG GCG GCC ACC TAC GCG CCA 360 <u>asp val val pro glu ser thr pro leu gly ala thr tyr ala pro</u></p> <p>GAA GAG TAG 369 glu glu *</p> <p>cca toq gtc cat cca cat gca tga tga tcc ttc cat cca tct gat 45</p> <p>tta gtt cga ttt tcc ttg tgt ttt gpa acg aat tgt tgc aaa tta 90</p> <p>cat gtt caa aga cat atg ttg cac gaa att ttt tac taa aza 132</p> </div> <div style="width: 45%; text-align: right;"> <p>-24</p> </div> </div>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/AT 94/00039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 5 C12N15/29 C07K13/00 A61K39/36 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, vol.97, 1992, BASEL, CH pages 287 - 294 R.VALENTA ET AL. 'Diagnosis of Grass Pollen Allergy with Recombinant Timothy Grass ( <i>Phleum pratense</i> ) Pollen Allergens' cited in the application see page 288, left column, paragraph 2 --- -/--	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 1994

Date of mailing of the international search report

07.10.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Cupido, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/AT 94/00039

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	FEBS LETTERS., vol.335, no.3, 13 December 1993, AMSTERDAM NL pages 299 - 304 C.DOŁECEK ET AL. 'Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen' see page 303, right column, paragraph 1 -----	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AT 94/00039

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
    Remark: Although Claim 14 is related to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/AT 94/00039

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 5 C12N15/29 C07K13/00 A61K39/36 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY, Bd.97, 1992, BASEL, CH Seiten 287 - 294 R.VALENTA ET AL. 'Diagnosis of Grass Pollen Allergy with Recombinant Timothy Grass (Phleum pratense) Pollen Allergens' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 288, linke Spalte, Absatz 2 --- -/--	1-11



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. September 1994

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07. 10. 94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cupido, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. = Aktenzeichen  
PCT/AT 94/00039

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>FEBS LETTERS., Bd.335, Nr.3, 13. Dezember 1993, AMSTERDAM NL Seiten 299 - 304 C.DOŁECK ET AL. 'Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen' siehe Seite 303, rechte Spalte, Absatz 1 -----</p>	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT94/00039

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Obwohl Anspruch 14 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/  
tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete  
sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung.
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.